



FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Monografia de Revisão Bibliográfica

***“Presença De Biomoléculas Gástricas Na  
Cavidade Oral: Consequências Bioquímicas e  
Fisiopatológicas”***

Ana Carolina Pardelinha Mendes Rodrigues

Porto, 2016



FACULDADE DE  
MEDICINA DENTÁRIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Unidade Curricular:**

Monografia de Investigação ou Relatório de Atividade Clínica

**Autor: Ana Carolina Pardelinha Mendes Rodrigues**

**Aluna do 5º ano do Mestrado Integrado de Medicina Dentária**

Contacto: [acarolinapmrodrigues@gmail.com](mailto:acarolinapmrodrigues@gmail.com)

**Orientador: Prof. Doutor João Miguel Silva e Costa Rodrigues**

**Professor Auxiliar Faculdade Medicina Dentária da Universidade do Porto**



# AGRADECIMENTOS:

---

*“If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants”*

- Isaac Newton

Faz para mim todo o sentido começar estes agradecimentos com esta citação porque a verdade é que se vi a meta e a atingi foi graças a todos os gigantes que me permitiram sempre mais à frente desde que este percurso teve início.

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador, João Miguel Silva e Costa Rodrigues, por toda a paciência e disponibilidade que sempre demonstrou, não só na elaboração desta tese mas por, desde o primeiro contacto, mostrar o que um verdadeiro Professor deve ser.

Agradeço à minha companheira de curso e grande amiga, Raquel Cupertino por me ter acompanhado fielmente nestes anos de faculdade em todos os momentos sem hesitações.

A todos os meus amigos que facilitaram o meu percurso e que mesmo não referindo cada um deles não esqueço o valor que cada um deles teve neste caminho, mas, devo um agradecimento particular a 3 deles, à Inês Moreira pela orientação e ensinamentos que me tornaram certamente uma profissional mais humana. A Ana Eduarda por estar ao meu lado desde sempre, e ao João Ribeiro que apesar de aparecer mais tarde neste percurso nunca deixou de demonstrar a sua amizade em todos os momentos mais difíceis.

Um agradecimento especial a toda a minha família, aos meus grandes pais não só pela oportunidade que me deram de poder frequentar esta faculdade, mas pelo apoio incondicional em todas as decisões que tomei. Ao meu irmão Francisco por ser o meu maior entusiasta e por fim, à minha tia Alice Monteiro que me ajudou desde sempre a trilhar o caminho que não culmina neste momento de formação, mas em toda a postura que poderei ter na vida.

# RESUMO:

---

**Resumo:** As doenças de refluxo gastroesofágico estão cada vez mais presentes no dia a dia, sendo possível verificar que as suas manifestações não se limitam apenas ao esófago, mas que os sintomas extra-esofágicos podem atingir locais como a cavidade oral, os pulmões e o ouvido médio. Os efeitos que a acidez do refluxo causa nas estruturas orais tem sido amplamente estudado mas os efeitos provocados pelas enzimas que esse mesmo conteúdo refluxado contém são ainda subvalorizados. Todos os estudos que foram feitos no sentido de perceber o impacto que a pepsina apresenta na cavidade oral revelam que os epitélios são afetados pela degradação enzimática.

**Objetivos:** Compreender o papel que a degradação enzimática causada pela pepsina tem na cavidade oral dos pacientes com doenças de refluxo gastroesofágico.

**Material e Métodos:** Recorreu-se à base de dados Pubmed na pesquisa de Artigos e a livros que se encontravam na Biblioteca da Faculdade de Medicina Dentária do Porto.

**Desenvolvimento:** Inúmeros estudos recentes vieram mostrar que a pepsina, ao contrário do que se pensava anteriormente, apresenta funcionalidade em valores de pH superiores aos que existem no estômago e quando sujeita a valores de pH até 7.8 a sua inatividade é reversível. Isto permitiu que fosse colocada a hipótese de que esta poderia ter um papel relevante na lesão dos tecidos em que entra em contacto. Os estudos efetuados pelos diversos autores demonstram que se verificam alterações na mucosa e dentina. O esmalte não é afetado por não possuir quantidades significativas de matéria orgânica e, ao nível da saliva, os estudos mostram que as propriedades físicas da saliva são alteradas.

**Conclusão:** A degradação enzimática que ocorre nas estruturas deve ser investigada mais aprofundadamente e para isso são necessários mais estudos sobre o tema.

**Palavras-chave:** Pepsin, Oral Cavity, Gastroesophageal Reflux Disease, Dentin, Enamel, Mucosa, Saliva, Collagen, GERD, Mucin

# ABSTRACT:

---

**Summary:** As gastroesophageal reflux diseases are increasing day-to-day and it has been observed that the manifestations are not limited the esophagus and the extraesophageal symptoms can reach as far as the oral cavity, lungs and middle ear. The effect caused by the acid in the reflux in the oral structures has been widely studied but the effects that enzymes contained in the same reflux are still underpriced. All studies demonstrated that pepsin presents consequences in oral cavity and all epithelium that has proteins compounds in its composition that are affected by enzymatic degradation.

**Objectives:** Understand the role that enzymatic degradation caused by pepsin has in the oral cavity of patients with gastroesophageal reflux disease.

**Materials and Methods:** The articles used in this revision were obtained from Pubmed data base and the books used were all available in the library of Dental Medicine Faculty of Dental of Porto.

**Development:** Several recent studies show that pepsin contrary to what was previously thought shows functionality in higher pH values that the ones that exist in the stomach and when subjected to pH values up to 7.8 the enzyme is inactive but its reversible. This allowed to formulate the hypothesis that the pepsin could have a relevant role in the injury of the different tissues. The studies made by various authors demonstrate relevant changes occur in the mucosa and dentin but in the enamel that effect is not noted because the amount of organic matter present it's insignificant. In saliva the studies reveal that its physical proprieties are altered.

**Conclusion:** Enzimatic impact in oral structures should be investigated more profoundly.

**Keywords:** pepsin, oral cavity, gastroesophageal reflux disease, dentin, enamel, mucosa, saliva, collagen, GERD, Mucin

# ÍNDICE:

---

AGRADECIMENTOS: .....	3
RESUMO: .....	4
ABSTRACT: .....	5
ÍNDICE: .....	6
INTRODUÇÃO:.....	7
MATERIAIS e MÉTODOS .....	9
DESENVOLVIMENTO: .....	10
Cavidade Oral: Os Seus Componentes Principais .....	10
Pepsina: Compreender O Seu Funcionamento .....	12
Efeito da Pepsina Na Mucosa .....	13
Efeito da Pepsina Nos Tecidos Duros .....	16
Efeito da Pepsina Na Saliva .....	18
CONCLUSÃO: .....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
ANEXOS .....	24

# INTRODUÇÃO:

---

Na literatura médica está bem estabelecido que as patologias sistêmicas têm influência nos diferentes locais do corpo. Entre estas patologias, as doenças do sistema gástrico são de grande relevância pela sua prevalência cada vez mais elevada. Um grupo de patologias que afeta este sistema são as doenças de refluxo gastroesofágico, que assumem uma importância significativa no contexto da Medicina Dentária, pois a cavidade oral representa um local de contacto do meio externo com o sistema digestivo, e tem uma relação íntima com o estômago sobretudo pela proximidade anatômica das duas estruturas.

O estômago é responsável pela digestão dos alimentos ingeridos pelo indivíduo. Essa digestão ocorre pela ação de enzimas especializadas e pela descida acentuada de pH, que acontece quando há um estímulo para a produção do suco gástrico. Esse estímulo é desencadeado, maioritariamente, pela presença de alimentos no lúmen do estômago.<sup>(1)</sup> O suco gástrico, fluído secretado pelo estômago, é uma mistura das secreções das células da superfície epitelial e das secreções das glândulas gástricas. Os principais componentes secretados pelo estômago são: o  $H^+$ , que provoca a acidificação característica desse suco digestivo que permite, por um lado, a conversão de pepsinogénio inativo em pepsina, que é a enzima responsável por iniciar a digestão de proteínas no estômago, e por outro lado impede a invasão e colonização do intestino por bactérias e outros patogénicos ingeridos; o  $HCO_3^-$  e muco que permitem a proteção da mucosa gástrica contra o ambiente luminal ácido e péptico; o fator intrínseco que permite a absorção de vitamina B12 (cobalamina).

Apesar da variedade de compostos que o estômago secreta, o principal constituinte orgânico do conteúdo é o pepsinogénio (pró-enzima inativa da pepsina) que está contido em grânulos de zimogénio ligados à membrana das células principais.<sup>(1)</sup> Quando ocorre a chegada de elementos proteicos ao estômago, estes estimulam a mucosa gástrica a secretar uma hormona designada de gastrina, que tem a capacidade de estimular a secreção, por um lado de ácido clorídrico pelas células parietais, e por outro de pepsinogénio pelas células chefe das glândulas gástricas.<sup>(2)</sup> Desta forma, as células principais são estimuladas a libertar o conteúdo dos seus grânulos por exocitose, sendo o pepsinogénio convertido em pepsina ativa. Quando há uma diminuição do pH a conversão do pepsinogénio na forma ativa é mais rápida e quando ocorre o aumento do pH a pepsina é inativada.<sup>(3)</sup>

Em indivíduos saudáveis, ocorrem episódios de refluxo que são de cariz fisiológico e que rapidamente são neutralizados por fatores intrínsecos, tais como, os movimentos peristálticos



esofágicos, a existência de esfíncteres e pela ação neutralizante da saliva. Normalmente estas situações não costumam estar associadas a qualquer tipo de sintomas. As doenças de refluxo gastroesofágico desenvolvem-se quando a mucosa do esôfago se encontra exposta ao conteúdo gastroduodenal por um prolongado período de tempo. <sup>(4)</sup> Segundo a Classificação de Montreal, define-se doença de refluxo gastroesofágico a condição que é originada pelo refluxo do conteúdo estomacal e que causa sintomas e/ou complicações. Os sintomas mais comuns incluem pirose (azia), regurgitação, sendo que sintomas extra-esofágicos como asma, tosse crônica, laringite e halitose estão a ser cada vez mais classificados como consequência desta patologia. <sup>(5)</sup> Ou seja, nestes doentes, há falhas em uma ou mais barreiras fisiológicas protetoras e ocorre o contacto do conteúdo estomacal e, conseqüentemente, das biomoléculas gástricas, com estruturas como o esôfago, pulmões, e cavidade oral, entre outras. <sup>(2)</sup>

Neste contexto, é importante salientar que a informação e descrição sobre a relação entre alterações na cavidade oral e patologias de refluxo na literatura é escassa, apesar das mesmas serem, muitas vezes, feitas pelos médicos dentistas. <sup>(6)</sup>

Na cavidade oral, como em todas as estruturas orgânicas, existem inúmeras proteínas que desempenham funções essenciais para a manutenção da homeostasia das estruturas envolvidas. Uma vez que a pepsina degrada proteínas, independentemente da sua origem ou função, virtualmente qualquer estrutura da cavidade oral poderá ser afetada pela presença de pepsina na mesma. Assim, o objetivo desta monografia é fazer uma revisão da literatura atual sobre os efeitos bioquímicos, e os mecanismos fisiopatológicos subjacentes, da presença de biomoléculas gástricas, mais especificamente da pepsina, sobre o esmalte, dentina e mucosa oral e o seu impacto na cavidade oral.

# MATERIAIS e MÉTODOS

---

A elaboração desta revisão bibliográfica baseou-se na evidência empírica e científica, para atingir os objetivos estipulados para o maior benefício dos pacientes.

Relativamente à pesquisa necessária para a execução desta revisão bibliográfica foram utilizados livros disponíveis na biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, bem como informação resultante da pesquisa na Internet, recorrendo à base de dados Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) e na Biblioteca Virtual da Universidade do Porto ([biblioteca.up.pt](http://biblioteca.up.pt)).

Foram utilizados critérios de inclusão, nomeadamente, artigos escritos em Inglês, artigos de revisão e ensaios clínicos, e artigos escritos desde 2000, foram feitas exceções em 6 artigos em que se verificou que o seu conteúdo era de todo o interesse na elaboração desta revisão.

Como critérios de exclusão foram eliminados os artigos a que não se conseguiu o acesso, e todos aqueles que não tinham associado o artigo em pdf.

As palavras-chave para a pesquisa foram “pepsin”, “oral cavity”, “gastroesophageal reflux disease”, “pathophysiology”, “saliva”, “enamel” e “dentin”, “collagen”, “mucin” and “GERD”. Além disso, foram feitas pesquisas com diferentes combinações das várias palavras-chave.

# DESENVOLVIMENTO:

---

## *Cavidade Oral: Os Seus Componentes Principais*

---

A cavidade oral é totalmente revestida por uma membrana mucosa protetora, onde estão incluídos, por um lado os recetores de sabor presentes na língua e por outro, as glândulas salivares acessórias tanto do tipo mucoso como do tipo seroso. O epitélio da mucosa oral é do tipo escamoso estratificado que é queratinizado em locais que podem estar sujeitos a fricção. Este epitélio é suportado por colagénio denso que se denomina por lâmina própria. Em áreas de grande mobilidade como o palato mole e o pavimento da boca, a lâmina própria encontra-se associada a tecido submucoso laxo e nos locais onde a submucosa recobre o osso, tais como, no palato duro e na zona do processo alveolar, a lâmina própria encontra-se intimamente ligado ao perióstio.<sup>(7)</sup>

As matrizes do esmalte e dentina apresentam a mesma função, ao serem as responsáveis por criar um microambiente favorável para ocorrer a deposição da hidroxiapatite.<sup>(8)</sup> O esmalte é o tecido que reveste a coroa do dente, e apresenta características distintas por ser um tecido altamente mineralizado<sup>(7)</sup>, acelular, mas acima de tudo por ser o único tecido orgânico que não tem colagénio na sua constituição.<sup>(8)</sup> A sua componente inorgânica é essencialmente hidroxiapatite, mas também contém em menor percentagem carbonatos e metais. O seu reduzido componente orgânico é constituído essencialmente por água, proteínas e lípidos.<sup>(7)</sup> Este tecido tem características únicas que o distinguem dos outros e uma é o arranjo iónico dos cristais que o constituem. Estes são bastante semelhante aos cristais da hidroxiapatite cálcica, mas o tamanho e organização dos que se apresentam no esmalte são de tal forma únicos que a deposição dos mesmos é considerada como uma impressão digital cuja organização é ditada pela presença de três proteínas, a amelogenina, a ameloblastina e a enamulina. Estas proteínas são degradadas logo após a sua secreção e alguns produtos resultantes desta atividade proteolítica vão acumular-se na camada de esmalte mas tendem a desaparecer com a maturação do mesmo.<sup>(9)</sup>

A dentina apresenta uma matriz muito semelhante à do osso mas tem proporcionalmente uma maior percentagem de componentes inorgânicos, que se apresentam maioritariamente sob a forma de cristais de hidroxiapatite.<sup>(7)</sup> A matriz dentinária tem uma composição orgânica que é comum a outras matrizes de tecidos orgânicos. Ela é composta maioritariamente por colagénio

do tipo I, mas também tem na sua constituição proteoglicanos, glicoproteínas, ácido hialurónico, entre outros. Apesar das semelhanças, apresenta também proteínas específicas, nomeadamente, a fosfoforina dentinária, a sialoproteína dentinária e a “distinctive dentin matrix protein (DMP-I)”.<sup>(8)</sup>

Quanto à saliva, as suas características estão intimamente ligadas às suas funções. Este fluido é constituído por cerca de 99% de água e a sua viscosidade é conferida pelo seu conteúdo proteico e iónico.<sup>(10)</sup> O conteúdo proteico da saliva varia conforme a glândula em que é produzida. Ainda assim, há uma base comum, que é o transportador de IgA, o principal anticorpo presente na saliva. As outras proteínas são produzidas apenas em alguns locais, tais como, as mucinas, as proteínas ricas em prolina, cistatinas e histatinas.<sup>(10)</sup>

As mucinas são produzidas nas glândulas submandibular, sublingual e glândulas menor, já as glândulas exclusivamente serosas não as produzem. Estas são glicoproteínas de alto peso molecular com uma estrutura alongada e que contribuem significativamente para o comportamento viscoelástico da saliva. Este tipo de comportamento é importante para permitir que a saliva se espalhe e seja retida sobre as superfícies da mucosa oral. Isto é importante pois confere lubrificação à mucosa e aos dentes, impedindo que a mucosa sofra danos e que os dentes fraturem.<sup>(10, 11)</sup> A “*statherin*”, é outra proteína salivar que parece ser importante para as propriedades físicas da saliva pois é responsável pela formação da película salivar que se forma nos dentes e que permite a lubrificação dos mesmos.<sup>(10)</sup>

As proteínas ricas em prolina (PRP) podem ser básicas ou ácidas, sendo que as primeiras são, aparentemente, produzidas pelas glândulas parótidas e as segundas são produzidas pelas glândulas submandibulares e parótidas. As PRPs são altamente polimórficas e esse facto leva a que existam quase 50 tipos diferentes desta família proteica.<sup>(10)</sup>

A amilase é a proteína mais abundante na saliva. Estudos recentes feitos por Butterworth vieram contestar a crença de que a função mais importante desta enzima seja a de iniciar o processo de digestão do amido na cavidade oral, tendo sido proposto que o motivo para a sua abundância poderá ser o de dissolver os resíduos alimentares que ficam na cavidade oral, diminuindo desta forma o substrato para o crescimento bacteriano.<sup>(10)</sup>

Outras proteínas existentes em menores quantidades são as histatinas e as cistatinas. As primeiras são responsáveis por controlar o crescimento fúngico na cavidade oral e as segundas estão envolvidas no controlo de eventos proteolíticos que ocorrem no tecido periodontal.<sup>(12)</sup>

Os diversos componentes iónicos da saliva, tal como o cálcio e o fósforo, são influenciados pelos componentes proteicos que se encontram neste fluido a cada momento. A

presença de uma concentração adequada destes dois íons é essencial para a homeostasia dentária, uma vez que, eles se encontram sobressaturados para que não ocorra a dissolução dos cristais de hidroxiapatite quando os dentes se encontram expostos a fluidos orais, alimentos ou a ácidos provenientes tanto de alimentos como de bebidas.<sup>(10)</sup>

---

### ***Pepsina: Compreender O Seu Funcionamento***

---

A pepsina é uma proteinase aspártica, é bilobada e uma das suas superfícies é côncava, sendo que essa concavidade encontra-se preenchida por uma pró-parte que é removível. É, por isso, sintetizada sob a forma de um zimogénio designado por pepsinogénio. Quando a molécula entra em contacto com o ácido gástrico, a parte removível liberta-se tornando exposta a parte côncava que é a zona responsável pela função enzimática. Apesar de ser necessário um pH ácido (inferior a 6) para que este fenómeno ocorra, logo que exista pepsina ativa, esta continua a ativar as restantes formas inativas, através de um fenómeno autocatalítico.<sup>(13)</sup>

O estudo desta molécula foi, recorrentemente, realizado por eletroforese do conteúdo gástrico. Os resultados mostram que a molécula apresenta 8 formas funcionais e o seu agrupamento é feito pela mobilidade que estas apresentam no teste eletroforético. Isto vem demonstrar que a pepsina não é apenas uma molécula mas uma família de isoenzimas que são estruturalmente similares. Porém, apesar de as isoenzimas serem semelhantes, uma das diferenças que estas apresentam entre elas é o pH ótimo para a sua ação máxima, o que permite que a digestão ocorra num intervalo de pH mais amplo.<sup>(13)</sup>

Os estudos realizados ao longo de 40 anos sobre a estabilidade da enzima são praticamente unânimes nas suas conclusões, isto é, a mesma é determinada maioritariamente pelo pH do ambiente circundante. No entanto estudos recentes reexaminaram a relação pH-pepsina em condições de baixa acidez e trouxeram novas conclusões que podem ter um importante impacto clínico. Nesses estudos observou-se que a pepsina isolada é menos estável e torna-se irreversivelmente inativada a partir de um pH de 7.1, mas a mistura de pepsina tal e qual a que se encontra no estômago é muito mais estável, tornando-se irreversivelmente inativa apenas quando se encontrava exposta a um ambiente de pH superior a 7.8. Uma das conclusões mais interessantes a que se chegou foi que entre o pH 6 a 8 observa-se uma fase de “latência enzimática”, na qual a enzima se encontra inativa mas intacta e pode consequentemente ser

ativada quando o pH é menor que 6. Esta informação veio desafiar a visão que se tinha dos efeitos extra-esofágicos da mesma.<sup>(13)</sup>

---

### *Efeito da Pepsina Na Mucosa*

---

A estrutura de um tecido é definida pela integridade da componente extracelular e intracelular, assim ela é dependente da adesão célula-célula e da interação célula-matriz. O citoesqueleto da célula encontra-se ligado aos complexos de adesão e esta relação é essencial para a homeostasia do tecido pois o comportamento celular e a expressão de genes são regulados pela informação que a célula obtém do microambiente que a rodeia. Desta forma, a interrupção deste caminho de informação pode levar à rutura da arquitetura correta do tecido.<sup>(14)</sup> A perda de E-caderina, que é a molécula responsável pela adesão célula-célula, tem sido sugerida como uma hipótese para a resposta do desenvolvimento neoplásico, isto porque, quando há mutações no gene que codifica para esta molécula, assim como nas alfa, beta e gama cateninas, juntamente com a ativação de fatores de crescimento epitelial, o resultado é a alteração da adesão celular.<sup>(15)</sup> Por outro lado a manutenção da correta estrutura do citoesqueleto é também importante pois este é o responsável pela forma da célula, sendo que este esqueleto celular tem como um dos seus elementos centrais as citoqueratinas.<sup>(16, 17)</sup> Assim, para termos um tecido saudável é necessário que não só os componentes celulares estejam a funcionar corretamente mas toda a relação célula e ambiente seja mantida nas condições ideais.<sup>(15)</sup>

A presença de conteúdo gástrico fora dos locais normais causa uma falha do equilíbrio ambiental para o qual as células estão programadas, e o interesse no efeito que este tem nos tecidos foi aumentando ao longo do tempo. Então, surgiram diversos estudos que visaram elucidar qual o efeito que não só o ácido gástrico tinha nas mucosas com que entrava em contacto, mas se os seus compostos produziam alguma alteração na gravidade com que estes tecidos eram afetados. Na verdade, este interesse foi despoletado quando se chegou à conclusão de que os fármacos utilizados para o tratamento do refluxo gastroesofágico, os inibidores da bomba de protões, apresentavam uma elevada eficiência na neutralização do ácido mas, por um lado, não diminuía o número de episódios de refluxo e, por outro também não tinham um efeito relevante sobre as enzimas presentes na infusão ácida proveniente do estômago.<sup>(13)</sup>

Quando a mucosa das diferentes regiões por onde o conteúdo gástrico passa é sujeita ao pH baixo do mesmo, os seus mecanismos de defesa são ativados. Um deles é a capacidade das

células epiteliais tamponarem o ambiente ácido a que estão sujeitas, e isso é conseguido através da anidrase carbónica. Esta capacidade é obtida pela hidratação reversível do  $\text{CO}_2$  que origina  $\text{HCO}_3^-$  e iões  $\text{H}^+$ . O bicarbonato originado é expulso da célula e consegue tamponar os iões de hidrogénio oriundos do conteúdo gástrico.<sup>(18)</sup> Estudos realizados por Axwell vieram esclarecer o papel da anidrase carbónica III no caso de refluxo gastroesofágico. Os resultados desse estudo revelaram um aumento dessa enzima no esófago em resposta ao ácido, sendo que o mesmo não acontece na laringe. No caso da segunda não se verifica um aumento da anidrase carbónica em caso de refluxo gastroesofágico e na zona das cordas vocais nem se verifica a existência da mesma, o que pode ser indicativo que este órgão é mais suscetível a lesões em caso de patologia de refluxo do que o esófago.<sup>(19)</sup> Estudos realizados mais tarde pelos mesmos autores vieram mostrar as diferenças na laringe de pacientes saudáveis e pacientes com refluxo e para isso analisaram as diferenças observadas nas mucinas, na anidrase carbónica e na E-caderina. As conclusões foram que, há zonas da laringe, como o epitélio das cordas vocais onde não se verifica a expressão de CA III quando sujeito a um ataque ácido, mas há outras zonas como a comissura posterior que apresenta a expressão de CA III aumentada, mas ao fim de alguns minutos esta começa a diminuir. O mais interessante neste estudo de Axwell é que a capacidade de tamponamento da laringe retoma a normalidade após a exposição a uma infusão de ácido mas quando está exposta a uma infusão de ácido com pepsina a capacidade de tamponamento não retoma a normalidade e é irreversivelmente alterada, diminuindo a capacidade de defesa da mucosa. Esta ação da pepsina na mucosa verificou-se em infusões com pH até 6. Quanto à mucina e E-caderina, foram registadas alterações na sua estrutura, mas não foi possível compreender se esta alteração era causada pelo refluxo ou se era secundária à inflamação originada.

Os estudos realizados por Goldberg et al, vieram confirmar que os danos causados nas mucosas em contacto com o conteúdo gástrico não eram causados apenas pela acidez, mas também pela pepsina que se encontra presente. Estes basearam-se na exposição de esófagos de felinos a uma infusão de ácido clorídrico com diferentes pHs e composições, de forma a, posteriormente, se verificar quais as alterações que ocorriam. As conclusões chegadas foram que, quando exposta a um pH de 1 a 2.3, a mucosa esofágica sofria lesões na presença do ácido com pH=1, sendo que o pH= 2.3, nem chegava a alterar visivelmente a mucosa. Por outro lado, quando era adicionada pepsina à infusão de ácido clorídrico, para um intervalo intermédio de pH de 1.6 a 2.0, os danos causados nas mucosas eram proporcionais à quantidade de pepsina adicionada, independentemente do pH em causa. Desta forma, demonstraram que a mucosa do

esôfago pode ser danificada pelo refluxo e esse dano está também relacionado com a presença da enzima.<sup>(13)</sup>

Por sua vez, Johnston e os seus colaboradores estudaram o efeito da pepsina humana 3B, que é a fração com maior atividade presente no conteúdo gástrico, no epitélio da laringe e perceberam que o efeito nos tecidos extra-esofágicos é subtil mas sustentado ao longo do tempo, causando depleção das defesas celulares e, em última instância, levando à sua inviabilidade. O mecanismo pelo qual isto acontece parece envolver a adesão da pepsina às células epiteliais, sendo posteriormente endocitada e causando danos intracelulares. Baseando-se em biópsias realizadas em laringes de pacientes com refluxo laríngeo-esofágico e comparando com um grupo de controlo foram feitas três grandes observações. A primeira é que é possível encontrar pepsina aderida ao epitélio laríngeo em caso de refluxo e quando ativa, a enzima se estiver aderida ao tecido vai causar danos das junções intercelulares e degradar as proteínas responsáveis pela defesa celular a partir do interior das mesmas, o que não se verifica no grupo de controlo. A segunda observação foi que a endocitose é mediada por um recetor competitivo que é encontrado em vesículas na região do sistema de Golgi. Presume-se que estes recetores não sejam específicos para a pepsina e que sirvam outro propósito, mas quando expostos a esta enzima promovem a sua internalização. Por fim, a terceira observação foi a de que as células epiteliais quando expostas à pepsina humana 3B, a um pH de 7.4, ou seja, quando a enzima supostamente estaria inativa, sofrem alterações no seu interior. O complexo de Golgi no seu conjunto, desde o retículo até às vesículas associadas, apresenta um pH de, aproximadamente, 5.5, o que acontece é que este ambiente mais ácido é capaz de reativar a pepsina e as alterações parecem ser causadas por esse motivo. As transformações podem ser observadas por microscopia eletrónica, sendo observado que as células aumentam de volume e as suas mitocôndrias encontram-se danificadas desde a primeira hora de exposição à protease, até às 12h seguintes. O dano inicial é acompanhado de um aumento da expressão de genes envolvidos no stress celular e toxicidade, incluindo algumas “heat shock proteins”, proteínas que são ativadas quando os mecanismos de stress celular estão em funcionamento. As alterações celulares mais tardias passam pela diminuição da expressão de diversos genes.<sup>(20)</sup>

Desta forma podemos resumir a cascata de eventos da seguinte forma: numa primeira instância, a pepsina inativa vai aderir ao epitélio; de seguida, os recetores existentes nas vesículas produzidas no complexo de Golgi vão reconhecer e endocitar a protease; uma vez exposta ao ambiente mais ácido que o complexo de Golgi fornece no interior da célula, a pepsina é ativada e causa dano celular; isto vai induzir nas células epiteliais stress oxidativo que leva à



acumulação de radicais livres de oxigénio, que por sua vez vão danificar as mitocôndrias, podendo em último caso levar à morte celular. Apesar do dano, as células são viáveis durante cerca de 12h mas perante exposição repetida, como é o esperado em casos de refluxo gastroesofágico crónico, o dano celular é tal que as células afetadas têm uma reduzida probabilidade de possuírem capacidade de sobrevivência.<sup>(19)</sup>

A laringe dispõe de mais que um tipo de epitélio. O primeiro, e mais cranial, é o epitélio pavimentoso estratificado do tipo escamoso, este epitélio não é queratinizado e recobre toda a zona desde a transição da faringe até à zona das cordas vocais. É classificado como um epitélio de transição tal como os que recobrem a cavidade oral, a hipofaringe e o esófago. O segundo epitélio é cilíndrico, pseudo-estratificado do tipo respiratório e recobre a maior parte da superfície laríngea.<sup>(7)</sup> O facto de a laringe apresentar uma parte da sua estrutura total recoberta por epitélio semelhante ao epitélio que recobre grande parte da cavidade oral, permite levantar a hipótese de que o mecanismo de ação pelo qual ocorre digestão enzimática das células epiteliais laríngeas seja semelhante ao que ocorre quando a pepsina atinge a cavidade oral. Isto porque a maquinaria celular é semelhante, o pH a que as duas zonas estão sujeitos é também similar e a frequência dos episódios de regurgitação é o mesmo. As condições de todos os estudos são então aplicáveis à cavidade oral pelo que podemos inferir que quando a pepsina atinge a boca e entra em contacto com todos os diferentes tecidos pode levar aos mesmos danos, em maior ou menor grau, dos observados na laringe.

---

### ***Efeito da Pepsina Nos Tecidos Duros***

---

A erosão dentária é definida pela perda de substância dentária por um processo químico que não envolve bactérias.<sup>(21)</sup> Este é um processo que ocorre durante um longo período de tempo até serem detetados clinicamente os seus efeitos. O desgaste é um processo multifatorial que pode ser relacionado com o ranger dos dentes, com a presença de ácido por fontes exógenas e por fontes endógenas como é o caso que se irá descrever. As lesões causadas são debilitantes para o dia a dia das pessoas, pois podem, em casos mais severos, impedir o normal funcionamento do sistema estomatognático, e o seu tratamento para além de prolongado é dispendioso. De forma a diminuir o impacto que o refluxo apresenta, e para que se possam prevenir danos irreversíveis causados na dentição, o aumento do conhecimento de forma a permitir um diagnóstico precoce é a base para a prevenção.<sup>(6)</sup>

Os ataques ácidos repetidos que os pacientes apresentam removem a película que recobre e protege o esmalte permitindo que o ácido entre em contacto direto com o mesmo. A camada de saliva é também removida neste processo e a combinação destes dois eventos origina a perda dos elementos protetores deste tecido levando à desmineralização do esmalte pelo ácido, pois este não sofre degradação enzimática.<sup>(6)</sup> Inicialmente, a erosão ácida causa alterações tanto mecânicas como físicas nas estruturas, pois leva à perda centrípeta dos cristais de hidroxiapatite.<sup>(22)</sup> Consequentemente, o primeiro sinal de desgaste que este demonstra é na sua consistência, que começa a tornar-se mais mole e áspera.<sup>(23)</sup>

A dentina tem uma composição diferente do esmalte, tem maior conteúdo orgânico, e como tal, perante um estímulo semelhante tem uma resposta diferente. A principal diferença é a de que esta para além de poder ser alterada pelo ácido é também passível de sofrer degradação enzimática. Assim, quando há a degradação da camada de esmalte e o ácido atinge a dentina, o que acontece é que a perda de estrutura dentinária vai dar-se mais rapidamente na transição entre a dentina peri e intertubular. Desta forma o que acontece inicialmente é a perda de dentina peritubular, o aumento do volume dos túbulos e por fim a desmineralização da dentina intertubular com exposição da matriz orgânica.<sup>(23)</sup> Um fator que se deve ter em conta neste desenvolver de eventos é a de que na estrutura da dentina os túbulos dentinários emergem desde a polpa dentária e direcionam-se para a periferia da dentina e a importância baseia-se no facto destes serem um caminho direto para a polpa dentária. Assim, qualquer fator que altere a dimensão, o volume e a química dos túbulos poderá ter repercussões clínicas, pois afeta a permeabilidade do tecido dentinário.<sup>(7)</sup>

Na dentina teoriza-se que a progressão do desgaste não é um fenómeno de superfície como no esmalte, mas um fenómeno baseado na difusão. Quando a dentina é exposta ao ácido de origem endógena, é então exposta a matriz que diminui a degradação desta estrutura mas quando esta é removida verifica-se uma progressão rápida do desgaste. A remoção da matriz pode ocorrer por degradação enzimática, uma vez que esta é composta maioritariamente por colagénio<sup>(24)</sup> e o conteúdo do refluxo proveniente do estômago possui na sua composição enzimas proteolíticas que podem desta forma levar ao desaparecimento da mesma.<sup>(22)</sup>

Ao longo do tempo foram feitos alguns estudos para verificar qual o real impacto da digestão proteica na matriz dentinária. Os estudos realizados em dentes íntegros tentaram aproximar-se do que é o ambiente intra-oral e isso foi conseguido expondo os dentes a temperaturas semelhantes à da boca, com um pH o mais fidedigno possível e fazendo os testes com diferentes combinações de soluções, tais como soluções apenas com ácido, ácido e pepsina

e ácido com uma combinação de pepsina mais tripsina, e comparando os efeitos destas soluções relativamente a grupos de controlo. Os efeitos foram medidos mensurando a quantidade de hidroxiprolina existente nas soluções, isto porque, este aminoácido é exclusivo do colagénio.<sup>(25)</sup> Os resultados demonstraram que, relativamente aos controlos e aos grupos que foram expostos apenas às soluções de ácido clorídrico, os grupos expostos a soluções que continham enzimas proteolíticas apresentavam maiores quantidades de hidroxiprolina livre. Estes resultados aparentemente traduziam que havia degradação da matriz dentinária, mas os exames de microscopia vieram demonstrar que, na realidade, ainda se verificava a presença de matriz, sendo que esta apenas apresentava uma menor espessura. Assim, a dentina torna-se menos protegida mas não totalmente vulnerável à erosão e consequente perda de estrutura.<sup>(22, 23, 26)</sup>

---

### ***Efeito da Pepsina Na Saliva***

---

A saliva atua como uma barreira protetora da mucosa que neutraliza o ácido a que esta pode estar sujeita e atua como moduladora das células epiteliais, principalmente pela presença de componentes como bicarbonato, prostaglandinas e fatores de crescimento epiteliais.<sup>(27)</sup>

As capacidades de proteção da saliva estão intimamente ligadas às proteínas que esta contém. Um estudo recente realizado por Madsen e colaboradores tinha como objetivo compreender de que forma a digestão proteolítica da mucina produzida pelas glândulas submaxilares atua nas propriedades da saliva. Estes recorreram à mucina de bovino e expuseram-na a pepsina. Os testes realizados demonstraram que quando a mucina é sujeita à pepsina, a molécula sofre degradação estrutural. Na verdade, analisando mais aprofundadamente, ela sofre um aumento de dimensão. Isto acontece pois a clivagem que a pepsina provoca é incompleta e leva à formação de agregados entre as ligações que se encontram disponíveis. A análise da adsorção da saliva neste estudo apresentou valores superiores para a saliva exposta à pepsina do que aquela que não tinha sofrido qualquer tipo de degradação. Ainda não se percebeu de que forma é que as alterações nas ligações moleculares influenciam a adsorção da saliva, pois apesar de ocorrer a formação de agregados moleculares, estes podem por um lado aumentar a adsorção pelo aumento das ligações de Van der Waals intermoleculares, ou por outro pode ocorrer uma conformação menos eficiente das macromoléculas na superfície do substrato. Uma vez que se

observou que a adsorção era superior à encontrada na saliva não degradada supõe-se que a primeira opção será a mais válida. Contrariamente à adsorção observou-se que as capacidades lubrificantes da saliva se perdem quando há ação enzimática pelo que a capacidade de formação da película salivar é reduzida mesmo com uma adsorção aumentada. <sup>(11)</sup> Este resultado vem confirmar os estudos clínicos que afirmam que o ácido e as enzimas proteolíticas presentes no conteúdo regurgitado levam a que rapidamente a placa e película aderida aos dentes seja removida da superfície dentária, tornando os dentes mais suscetíveis à desmineralização. <sup>(6)</sup>

Os outros estudos realizados ao longo do tempo visavam apenas a observação e análise das consequências clínicas que o refluxo, ácido e pepsina apresentavam na saliva. Estes concluíram, na sua maioria, que comparando grupos de pessoas com refluxo com um grupo controlo, não se verificavam diferenças estatisticamente significativas na quantidade de saliva estimulada, capacidade de tamponamento e nos valores de pH que esta tinha. No entanto, recentemente foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a relação entre refluxo, hipossalivação e xerostomia. <sup>(6)</sup> Campisi e os seus colaboradores executaram um estudo em que as suas conclusões mostravam que há efetivamente uma diminuição da saliva estimulada em paciente com GERD relativamente a um grupo de controlo, mas que a saliva basal era semelhante nos dois grupos, e que a capacidade de tamponamento nos casos de refluxo gastroesofágico apresentava valores superiores, pois o pH da saliva era mais alcalino pela presença de maiores quantidades de bicarbonato. <sup>(27)</sup> A diminuição da produção de saliva, origina não só xerostomia e sensação de boca ardente mas também alterações da mastigação, deglutição, fala, entre outras. Por outro lado leva a que haja menor capacidade de tamponamento do ácido que atinge a cavidade oral. <sup>(6)</sup>

# CONCLUSÃO:

---

As patologias de refluxo gastroesofágicas estão amplamente estudadas pela comunidade de gastroenterologia e cada vez mais se verifica um interesse de outras áreas em compreender as implicações fisiopatológicas dos locais anatómicos afetados pelas mesmas.

O interesse na área de medicina dentária do estudo do refluxo crónico é baseado no facto de as manifestações orais serem, em muitos casos, os primeiros sintomas a serem detetados, principalmente, nos casos em que não há esofagite. A questão imposta é que os estudos de investigação debruçam-se maioritariamente no impacto que o ácido que atinge a boca causa nas estruturas orais. Claro que este estudo foi, e é, de extrema importância pois a base das lesões causadas pela erosão passa pela descida do pH para valores muito abaixo dos esperados.

Nos últimos anos a investigação veio mudar o paradigma do funcionamento da pepsina, isto porque o que era tomado como certo é que esta se tornava inativa a valores inferiores aos que se verificou mais recentemente. Tendo assim em conta que a atividade proteolítica desta enzima se mantém para valores mais semelhantes aos que são encontrados na cavidade oral, em momentos que não o do refluxo, os seus efeitos sobre as componentes proteicas dos tecidos passam a ser um fator que deve ser tido em consideração quando são analisadas as causas de lesões orais.

A literatura sobre o efeito específico da pepsina sobre os tecidos orais é ainda muito reduzida. Sobre a mucosa, os estudos realizados ao nível da laringe permitem estabelecer algumas pontes sobre o possível mecanismo de ação que se pensa que poderá ocorrer. Quanto ao esmalte, sabe-se que este não é afetado por não possuir componentes orgânicos em quantidades relevantes, por outro lado o impacto enzimático na erosão dentinária é relevante pelo facto de a matriz dentinária ser constituída essencialmente por colagénio e este ser passível de ser degradado. Os estudos sobre os efeitos dentinários são ainda poucos mas já mostram que há uma degradação e consequente fragilização da matriz dentinária quando esta está exposta a enzimas como a pepsina. As alterações que ocorrem na saliva começam agora a ser estudadas mais aprofundadamente mas, pensa-se desde já que clinicamente, estas alterações vão provavelmente traduzir-se em lesões dentárias e mucosas mesmo em pacientes sem sintomas de refluxo e em pacientes que se encontram medicados e aparentemente com a doença controlada.

Concluindo, praticamente todas as estruturas e fluidos da cavidade oral podem ser afetados pela presença de suco gástrico e é de todo o interesse que os estudos na área médico

dentária venham aprofundar o conhecimento dos mecanismos pelos quais as lesões poderão ocorrer de forma a que se consiga diminuir o impacto a nível clínico.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Lehninger AC, Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry & Absolute Ultimate Guide: W.H. Freeman; 2008.
2. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Manual de Medicina de Harrison - 18ed: AMGH Editora; 2013.
3. Koeppen BM, Stanton BA. Berne and Levy Physiology: Mosby; 2008.
4. Colledge NR, Walker BR, Ralston SH. Davidson's Principles and Practice of Medicine: Elsevier Health Sciences UK; 2010.
5. Saritas Yuksel E, Hong SK, Strugala V, Slaughter JC, Goutte M, Garrett CG, et al. Rapid salivary pepsin test: blinded assessment of test performance in gastroesophageal reflux disease. The Laryngoscope. 2012;122(6):1312-6.
6. Ranjitkar S, Smales RJ, Kaidonis JA. Oral manifestations of gastroesophageal reflux disease. Journal of gastroenterology and hepatology. 2012;27(1):21-7.
7. Young B. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas: Churchill Livingstone/Elsevier; 2006.
8. Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. Connective tissue research. 1996;35(1-4):131-6.
9. Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. Connective tissue research. 2002;43(2-3):441-9.
10. Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. Annual review of food science and technology. 2013;4:267-76.
11. Madsen JB, Svensson B, Abou Hachem M, Lee S. Proteolytic Degradation of Bovine Submaxillary Mucin (BSM) and Its Impact on Adsorption and Lubrication at a Hydrophobic Surface. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids. 2015;31(30):8303-9.
12. Baron A, DeCarlo A, Featherstone J. Functional aspects of the human salivary cystatins in the oral environment. Oral diseases. 1999;5(3):234-40.
13. Bardhan KD, Strugala V, Dettmar PW. Reflux revisited: advancing the role of pepsin. International journal of otolaryngology. 2012;2012:646901.
14. Chesire DR, Ewing CM, Sauvageot J, Bova GS, Isaacs WB. Detection and analysis of beta-catenin mutations in prostate cancer. The Prostate. 2000;45(4):323-34.
15. Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. Current opinion in cell biology. 1997;9(5):683-90.
16. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. Annual review of biochemistry. 1994;63:345-82.

17. Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. Progress in nucleic acid research and molecular biology. 1998;61:1-23.
18. Johnston N, Bulmer D, Gill GA, Panetti M, Ross PE, Pearson JP, et al. Cell biology of laryngeal epithelial defenses in health and disease: further studies. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 2003;112(6):481-91.
19. Axford SE, Sharp N, Ross PE, Pearson JP, Dettmar PW, Panetti M, et al. Cell biology of laryngeal epithelial defenses in health and disease: preliminary studies. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 2001;110(12):1099-108.
20. Johnston N, Wells CW, Blumin JH, Toohill RJ, Merati AL. Receptor-mediated uptake of pepsin by laryngeal epithelial cells. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 2007;116(12):934-8.
21. Farahmand F, Sabbaghian M, Ghodousi S, Seddighoraee N, Abbasi M. Gastroesophageal reflux disease and tooth erosion: a cross-sectional observational study. Gut and liver. 2013;7(3):278-81.
22. Schlueter N, Ganss C, Hardt M, Schegietz D, Klimek J. Effect of pepsin on erosive tissue loss and the efficacy of fluoridation measures in dentine in vitro. Acta odontologica Scandinavica. 2007;65(5):298-305.
23. Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. Caries research. 2011;45 Suppl 1:13-23.
24. Carmichael DJ, Dodd CM, Veis A. The solubilization of bone and dentin collagens by pepsin. Effect of cross-linkages and non-collagen components. Biochimica et biophysica acta. 1977;491(1):177-92.
25. Schlueter N, Hardt M, Klimek J, Ganss C. Influence of the digestive enzymes trypsin and pepsin in vitro on the progression of erosion in dentine. Archives of oral biology. 2010;55(4):294-9.
26. Schlueter N, Glatzki J, Klimek J, Ganss C. Erosive-abrasive tissue loss in dentine under simulated bulimic conditions. Archives of oral biology. 2012;57(9):1176-82.
27. Campisi G, Lo Russo L, Di Liberto C, Di Nicola F, Butera D, Vigneri S, et al. Saliva variations in gastro-oesophageal reflux disease. Journal of dentistry. 2008;36(4):268-71.



## ANEXOS

---